

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.21.007
文章编号: 1005-8982 (2023) 21-0041-08

实验研究·论著

氯膦酸二钠脂质体不同给药剂量和方式 对骨髓巨噬细胞清除效果的研究*

王玉寒¹, 刘志婷¹, 徐紫洁¹, 王兆慧¹, 曾令宇¹, 孙静芳², 丁爽²

(1. 徐州医科大学 医学技术学院, 江苏 徐州 221000; 2. 徐州医科大学附属医院
检验科, 江苏 徐州 221000)

摘要: 目的 研究氯膦酸二钠脂质体不同给药剂量和方式对骨髓巨噬细胞的清除效果。**方法** 用雄性 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠复制异基因造血干细胞移植(HSCT)模型, 随机分为 HSCT 组、HSCT + ip100 组(HSCT+氯膦酸二钠脂质体腹腔注射 100 μ L)、HSCT + iv100 组(HSCT+氯膦酸二钠脂质体静脉注射 100 μ L)、HSCT + iv150 组(HSCT+氯膦酸二钠脂质体静脉注射 150 μ L)、HSCT + iv200 组(HSCT+氯膦酸二钠脂质体静脉注射 200 μ L)、HSCT + iv250 组(HSCT+氯膦酸二钠脂质体静脉注射 250 μ L)。HSCT 后第 1 天注射氯膦酸二钠脂质体, 之后每 5 天注射 1 次, 直至相应时间点获取样本。采用流式细胞术和 Western blotting 检测骨髓巨噬细胞数量的变化, 依据全血细胞计数确定外周血的变化, HE 染色观察骨髓腔损伤。**结果** 与 HSCT 组比较, 其余各组小鼠的外周血白细胞计数明显增加($P < 0.05$)。与氯膦酸二钠脂质体腹腔注射相比, 静脉注射骨髓巨噬细胞清除效果明显($P < 0.05$)。流式细胞术结果显示, 氯膦酸二钠脂质体静脉注射清除效果随着脂质体剂量的增加而更加明显。HE 染色结果显示, 随着氯膦酸二钠脂质体剂量的增加, 骨髓腔中的脂肪空泡越来越多。**结论** 氯膦酸二钠脂质体静脉注射清除骨髓巨噬细胞优于腹腔注射, 在一定剂量内, 骨髓巨噬细胞随着氯膦酸二钠脂质体注射剂量的增加, 清除效果越明显。

关键词: 氯膦酸二钠脂质体; 骨髓巨噬细胞; 造血干细胞移植

中图分类号: R457.7; R551.3

文献标识码: A

Research of effect of different doses and modes of liposome administration on the clearance of bone marrow macrophages*

Wang Yu-han¹, Liu Zhi-ting¹, Xu Zi-jie¹, Wang Zhao-hui¹, Zeng Ling-yu¹, Sun Jing-fang², Ding Shuang²

(1. School of Medical Technology, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221000, China;

2. Department of Laboratory Medicine, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221000, China)

Abstract: Objective To study the effects of different dosages and methods of Clodronate liposomes administration on the clearance of bone marrow macrophages. **Methods** Male BALB/c and females C57BL/6 mice were firstly used to establish an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) model, and were randomly divided into HSCT group, HSCT+ Clodronate liposome 100 μ L group (ip), HSCT + Clodronate Liposome 100 μ L group (iv), HSCT + Clodronate Liposome 150 μ L group (iv), HSCT + Clodronate Liposome 200 μ L (iv), HSCT + Clodronate Liposome 250 μ L group (iv). Mice were injected with different dose of Clodronate Liposome day 1 post HSCT and then every 5 days until corresponding time point. The changes in the number of macrophages

收稿日期: 2023-02-18

* 基金项目: 国家自然科学基金(No.: 81900106); 江苏省研究生创新工程项目(No.: KYCX21-2738)

[通信作者] 丁爽, E-mail: ds1012@126.com

in bone marrow were detected by flow cytometry and Western blot. The changes in peripheral blood were determined by complete blood count, and the injuries in bone marrow cavity were observed by H&E staining.

Results Compared with the HSCT group, the peripheral blood leukocyte counts of the other groups were significantly increased ($P < 0.05$); Compared with the intraperitoneal injection group, the intravenous injection group showed a significant enhancement on the clearance of bone marrow macrophages ($P < 0.05$); Flow cytometry results showed that the clearance effect on bone marrow macrophages became stronger as the dose of Clodronate liposome increased. Bone marrow pathology staining showed that the fat vacuoles in the bone marrow lumen increased more with the increase of dose of Clodronate liposome. **Conclusion** Compared with intraperitoneal injection, intravenous injection of Clodronate liposome showed a more significant bone marrow macrophage clearance effect, and the clearance effect of clodronate liposome on bone marrow macrophages increasing with a higher dosage in a certain dose range.

Keywords : clodronate-liposomes; bone marrow macrophage; hematopoietic stem cell transplantation

氯膦酸二钠脂质体是一种高极性化合物,可自由溶于水,亲脂性低。游离的氯膦酸二钠脂质体不容易通过细胞膜的磷脂双分子层,但脂质体可以被巨噬细胞吞噬并引起巨噬细胞凋亡^[1]。氯膦酸二钠脂质体已被广泛用于清除小鼠骨髓腔内巨噬细胞^[2]。临床研究已将氯膦酸二钠脂质体用于治疗 Paget 病、多发性骨髓瘤^[3]、肝脏纤维化^[4]和乳腺癌转移^[5],也用于减弱肺部缺血再灌注引起的肺部水肿^[6]。巨噬细胞在炎症反应中发挥重要作用^[7],清除巨噬细胞可降低慢性肝损伤大鼠的门静脉压力^[8],去除巨噬细胞还能够显著降低小鼠造血干祖细胞归巢效率^[9]。巨噬细胞是一种异质性的免疫细胞群,具有高度的可塑性,在骨髓微环境中发挥着各种不同的作用,巨噬细胞在骨髓微环境中至关重要^[10-11]。多数研究造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)后巨噬细胞在骨髓微环境中的作用实验都选择通过氯膦酸二钠脂质体去除巨噬细胞,但目前氯膦酸二钠脂质体的用药方式和剂量还不清楚。本研究根据实验室方法复制 HSCT 模型^[12],采用氯膦酸二钠脂质体清除骨髓巨噬细胞,通过设置一系列的剂量梯度,研究清除巨噬细胞的最佳注射剂量和注射方式。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 120 只, SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠 10 只, 6~8 周, 体重 18~20 g, 均购自北京维通利华实验技术有限公司。所有实验动物饲养于徐州医科大学(中国徐州泉山)的 SPF 级动物中心, 温度(22 ℃)和湿度(60%)稳定。实验动物生

产许可证号: SCXK(京)2021-0006, 实验动物使用许可证号: SYXK(苏)2021-0038。

1.2 主要试剂

CD11b、F4/80 流式抗体(美国 Biolegend 公司), 氯膦酸二钠脂质体(荷兰 Liposome 公司), CD11b 蛋白抗体(美国 Proteintech 公司), SDS-PAGE 凝胶试剂盒(中国碧云天生物技术有限公司), 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗, GAPDH(中国博世生物有限公司), PVDF 膜(美国 GE 公司), ECL 化学发光试剂(中国富百科生物技术有限公司)。

1.3 主要仪器

¹³⁷Se_γ 射线辐照器(德国 Gamma-Service Medical 公司), Western blotting 全套仪器(美国 Bio-Rad 公司), 血细胞分析仪(中国迈瑞公司), 流式细胞仪(美国贝克曼公司), BMJ-B 型包埋台和 BMJ-B 包埋冷台(常州中威电子仪器有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 小鼠 HSCT 模型复制 移植受鼠预处理: 雄性 BALB/c 小鼠为受鼠, 移植前 6~8 h 给予 7.5 Gy 致死剂量全身照射, 剂量率为 1.92 Gy/min, 分 4 次照射, 每次 1.875 Gy。制备供鼠骨髓细胞: 取雌性 C57BL/6 小鼠, 颈椎脱臼处死, 75% 酒精浸泡 5 min, 无菌取小鼠胫、股骨, 剪开骨骺端获取骨髓细胞悬液, 计数后根据结果调整细胞浓度, 按照每 220 μL 含 5×10^6 个细胞制备骨髓单个细胞悬液, 放置冰上备用。骨髓细胞移植: 6 h 后将制备好的供鼠骨髓细胞悬液经尾静脉注射至受鼠体内, 每只小鼠经尾静脉注射 220 μL 骨髓单个细胞悬液。

1.4.2 氯膦酸二钠脂质体去除 HSCT 后小鼠骨髓巨噬细胞 复制小鼠 HSCT 模型后, 于移植后第 1 天、

第 6 天、第 11 天、第 16 天、第 21 天、第 26 天时将氯膦酸二钠脂质体注射到小鼠体内。根据氯膦酸二钠脂质体注射方式和注射剂量将移植后的 120 只雄性 BALB/c 小鼠随机分为 6 组: HSCT 组、HSCT+ ip100 组 (HSCT+ 氯膦酸二钠脂质体腹腔注射 100 μL)、HSCT+ iv100 组 (HSCT+ 氯膦酸二钠脂质体静脉注射 100 μL)、HSCT+ iv150 组 (HSCT+ 氯膦酸二钠脂质体静脉注射 150 μL)、HSCT+ iv200 组 (HSCT+ 氯膦酸二钠脂质体静脉注射 200 μL)、HSCT+ iv250 组 (HSCT+ 氯膦酸二钠脂质体静脉注射 250 μL), 每组 20 只。根据实验分组, 经小鼠腹腔或尾静脉注射不同剂量的氯膦酸二钠脂质体。

1.4.3 流式细胞术检测巨噬细胞占比 分别于移植后第 7 天、第 21 天、第 28 天颈椎脱臼处死各组小鼠 5 只, 取小鼠胫、股骨, 剪开骨髓端获取骨髓细胞悬液。获取的骨髓细胞悬液经过滤后, 离心弃上清液, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 调整细胞密度为 1×10^7 个/mL, 流式管每管取 100 μL 骨髓细胞悬液, 加入 CD11b 和 F4/80 各 1 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 30 min, 再加入 PBS 3 mL 终止, 离心弃上清液, 加入 100 μL PBS 上机检测 CD11b⁺ 和 F4/80⁺ 巨噬细胞占比。

1.4.4 全血细胞计数仪计数外周血细胞 经氯膦酸二钠脂质体处理后的移植小鼠于第 7 天、第 14 天、第 21 天及第 28 天通过小鼠尾静脉获取外周血, 采集各小组小鼠外周血数滴于 EDTA 抗凝管内, 弹匀后通过血细胞计数仪检测小鼠外周血白细胞、红细胞及血小板。

1.4.5 Western blotting 检测 CD11b 蛋白相对表达量 收集相应时间点各组小鼠骨髓细胞沉淀, 提取骨髓细胞蛋白: 按照 5×10^6 个/100 μL 加入裂解液, 再加入裂解液体积 1% 的苯甲基磺酰氟, 冰上裂解 15 min, 5 min 振荡 1 次, 4 $^{\circ}\text{C}$, 15 000 r/min 离心 15 min, 取上清液至新的 EP 管中; 将上清液按照体积的 1/4 加入 $5 \times$ loading, 充分混匀; 将混匀后的上清放入金属浴 99 $^{\circ}\text{C}$, 15 min。将提取好的蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转膜至聚偏二氟乙烯膜上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 磷酸盐吐温缓冲液 (phosphate buffered saline with tween 20, PBST) 洗涤 4 次, 每次 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗过夜, 次日回收一抗后, 用 PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 室温孵育相应二抗 1 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 在 Image J 成像系

统进行显影, 扫描后与内参 β -actin 进行对比分析, 计算 CD11b 蛋白的相对表达量。

1.4.6 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色 相应时间点收集小鼠股骨在 4% 多聚甲醛中固定 48 h, 流水冲 2 h, 使用盐酸-甲酸脱钙 6 ~ 8 h 后, 再用流动水冲洗 2 h, 将股骨放入包埋盒中进行一系列梯度酒精脱水, 包埋机左、右蜡缸浸蜡, 将组织最大面朝下进行包埋。包埋好的蜡块可室温保存, 也可直接切片。石蜡在切片机上切成约 4 μm 薄片后, 放置摊片机中展开, 使用黏附载玻片将片子捞起后放入烘箱中烘 4 h, 然后将片子放二甲苯及梯度酒精中进行脱蜡复水, 再使用 HE 进行染色, 最后经脱水、透明、封片后, 放通风橱过夜, 第 2 天在光学显微镜下观察骨组织病理改变并拍照记录。

1.5 统计学方法

数据分析采用 Flow Jo 软件和 Graphpad Prism 8.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 两两比较用均数间的多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氯膦酸二钠脂质体对各组外周血的影响

不同时间点各组小鼠红细胞、白细胞、血小板计数结果显示, 第 7 天、第 14 天、第 21 天、第 28 天时外周血白细胞水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 HSCT 组比较, HSCT+ iv200 组和 HSCT+ iv250 组白细胞数量明显增多 ($P < 0.05$)。第 7 天、第 14 天、第 21 天时外周血红细胞水平比较, 经方差分析, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 第 28 天时外周血红细胞水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。第 7 天时外周血血小板水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 静脉注射氯膦酸二钠脂质体的各组均高于 HSCT 组 ($P < 0.05$); 随着时间延长, 注射氯膦酸二钠脂质体次数增加, 其他各组血小板计数开始减少; 第 14 天时外周血血小板计数比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 注射氯膦酸二钠脂质体组血小板计数均低于 HSCT 组 ($P < 0.05$); 第 21 天、第 28 天时外周血血小板计数比较, 经方差分析, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1 ~ 3。

表 1 各组不同时间的尾静脉外周血白细胞计数比较 ($n=20, \times 10^9/L, \bar{x} \pm s$)

组别	第7天	第14天	第21天	第28天
HSCT组	1.65 ± 0.18	4.71 ± 0.5	8.22 ± 2.46	7.61 ± 0.35
HSCT + ip100组	2.17 ± 0.36	7.40 ± 2.04	14.90 ± 0.71	15.37 ± 2.36 [†]
HSCT + iv100组	4.39 ± 0.63	6.87 ± 0.69	20.68 ± 1.77 [†]	18.15 ± 3.59 [†]
HSCT + iv150组	8.29 ± 0.79 [†]	8.27 ± 0.81	24.55 ± 4.37 [†]	33.15 ± 4.21 [†]
HSCT + iv200组	14.95 ± 1.25 [†]	17.99 ± 1.80 [†]	42.28 ± 3.85 [†]	34.48 ± 1.13 [†]
HSCT + iv250组	13.78 ± 1.63 [†]	16.12 ± 1.17 [†]	26.53 ± 2.17 [†]	31.40 ± 1.02 [†]
F值	74.500	35.130	33.590	27.380
P值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: †与HSCT组比较, $P < 0.05$ 。表 2 各组不同时间的尾静脉外周血红细胞计数比较 ($n=20, \times 10^{12}/L, \bar{x} \pm s$)

组别	第7天	第14天	第21天	第28天
HSCT组	9.59 ± 1.25	9.70 ± 0.2	10.35 ± 0.69	10.25 ± 0.17
HSCT + ip100组	10.19 ± 0.70	9.58 ± 0.1	9.64 ± 0.71	9.44 ± 0.43
HSCT + iv100组	9.71 ± 3.54	9.83 ± 0.13	10.1 ± 0.63	9.61 ± 0.16
HSCT + iv150组	9.59 ± 1.10	8.95 ± 0.68	9.93 ± 0.56	8.70 ± 0.35 [†]
HSCT + iv200组	12.23 ± 0.55	9.75 ± 0.29	10.27 ± 0.46	8.94 ± 0.23 [†]
HSCT + iv250组	10.02 ± 0.29	10.07 ± 0.59	9.64 ± 0.64	6.91 ± 0.44 [†]
F值	1.570	1.792	0.574	25.710
P值	0.242	0.190	0.719	0.000

注: †与HSCT组比较, $P < 0.05$ 。表 3 各组不同时间的尾静脉外周血小板计数比较 ($n=20, \times 10^9/L, \bar{x} \pm s$)

组别	第7天	第14天	第21天	第28天
HSCT组	133.67 ± 10.66	692.67 ± 20.04	878.33 ± 101.38	933.67 ± 40.31
HSCT + ip100组	274.33 ± 48.58	336.00 ± 24.66 [†]	832.00 ± 156.11	1 071.00 ± 142.20
HSCT + iv100组	327.00 ± 77.77 [†]	424.33 ± 115.38 [†]	926.00 ± 85.02	1 108.67 ± 138.05
HSCT + iv150组	317.67 ± 89.66 [†]	388.67 ± 34.99 [†]	1 007.00 ± 50.41	1 127.67 ± 169.97
HSCT + iv200组	390.00 ± 50.28 [†]	426.67 ± 41.30 [†]	914.67 ± 83.08	991.00 ± 127.78
HSCT + iv250组	322.00 ± 21.35 [†]	416.33 ± 16.76 [†]	664.67 ± 48.18	750.67 ± 80.39
F值	5.745	10.670	3.023	2.456
P值	0.006	0.000	0.054	0.094

注: †与HSCT组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 氯膦酸二钠脂质体不同注射方式对巨噬细胞清除效果的影响

HSCT组、腹腔注射组和静脉注射氯膦酸二钠脂质组,第7天时巨噬细胞比例比较,经方差分析,差异无统计学意义($P > 0.05$)。第14天时巨噬细胞比例比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$);与HSCT组比较,静脉注射组巨噬细胞清除效

果明显。见表4和图1。

2.3 氯膦酸二钠脂质体不同注射剂量对巨噬细胞清除效果的影响

通过收集各组小鼠骨髓细胞悬液,流式细胞术检测巨噬细胞清除效果,结果显示,第7天、第14天时巨噬细胞比例的比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$);氯膦酸二钠脂质体不同剂量组随

表 4 HSCT组、HSCT+ ip100组、HSCT+ iv100组
第 7 天和第 14 天时骨髓细胞中巨噬细胞比例比较
($n=20, \%, \bar{x} \pm s$)

组别	第 7 天	第 14 天
HSCT 组	2.20 ± 0.26	10.27 ± 0.82
HSCT + ip100 组	1.80 ± 0.14	8.44 ± 1.54
HSCT + iv100 组	1.69 ± 0.11	6.82 ± 0.16 [†]
F 值	4.372	5.809
P 值	0.067	0.040

注: †与 HSCT 组比较, $P < 0.05$ 。

随着注射剂量的增加, 骨髓细胞中巨噬细胞占比越来

越低, 当氯膦酸二钠脂质体剂量增加到 200 μL 和 250 μL 时, 两组间巨噬细胞占比没有明显变化(见表 5 和图 2)。为进一步验证 200 μL 和 250 μL 清除效果的差异, 经 Western blotting 检测骨髓细胞中 CD11b 蛋白相对表达量, 结果显示, HSCT 组、HSCT + iv200 组、HSCT+iv250 组 CD11b 蛋白相对表达量分别为 (1.18 ± 0.11)、(0.72 ± 0.11)、(0.72 ± 0.08), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 13.890, P = 0.006$); HSCT 组高于 HSCT+iv200 组、HSCT+iv250 组 ($P < 0.05$)。HSCT+iv200 组与 HSCT+iv250 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。

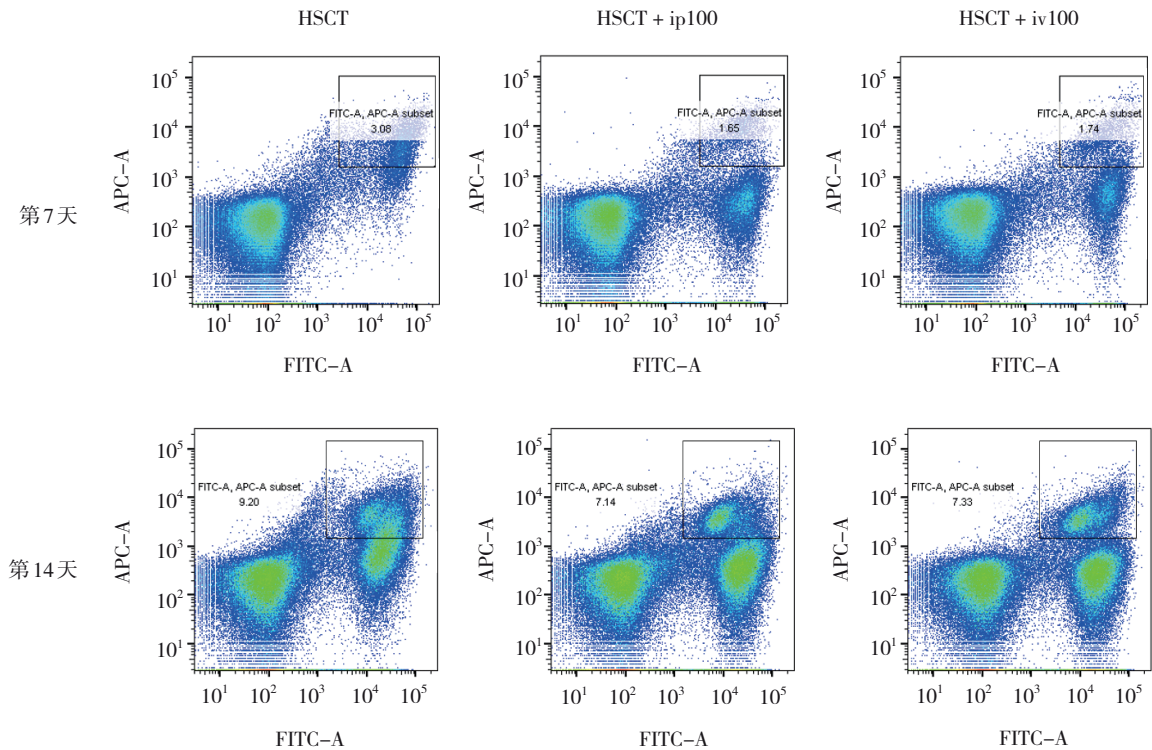


图 1 第 7 天和第 14 天时氯膦酸二钠脂质体不同注射方式巨噬细胞占比

表 5 骨髓细胞中巨噬细胞比例在第 7 天和第 14 天时的比较 ($n=20, \%, \bar{x} \pm s$)

组别	第 7 天	第 14 天
HSCT 组	2.53 ± 0.46	10.27 ± 0.82
HSCT + iv100 组	1.69 ± 0.11 [†]	6.92 ± 0.29 [†]
HSCT + iv150 组	1.61 ± 0.18 [†]	6.29 ± 0.21 [†]
HSCT + iv200 组	1.32 ± 0.14 [†]	5.77 ± 0.77 [†]
HSCT + iv250 组	1.29 ± 0.16 [†]	5.53 ± 1.24 [†]
F 值	8.436	12.620
P 值	0.003	0.001

注: †与 HSCT 组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 氯膦酸二钠脂质体静脉注射不同剂量对骨髓腔的影响

HE 染色结果显示, 第 7 天各组小鼠骨髓腔出血严重, 有空洞出现; 第 14 天各组骨髓腔出血明显好转, 炎症细胞浸润, 有脂肪空泡出现。相较于 HSCT 组, 注射氯膦酸二钠脂质体组小鼠的骨髓腔有大量脂肪空泡出现, 注射剂量 200 μL 组小鼠整个骨髓腔充满脂肪空泡, 100 μL 和 250 μL 组相较 200 μL 组, 脂肪空泡较少, 但是与 HSCT 相比, 空泡是增多的。见图 4。

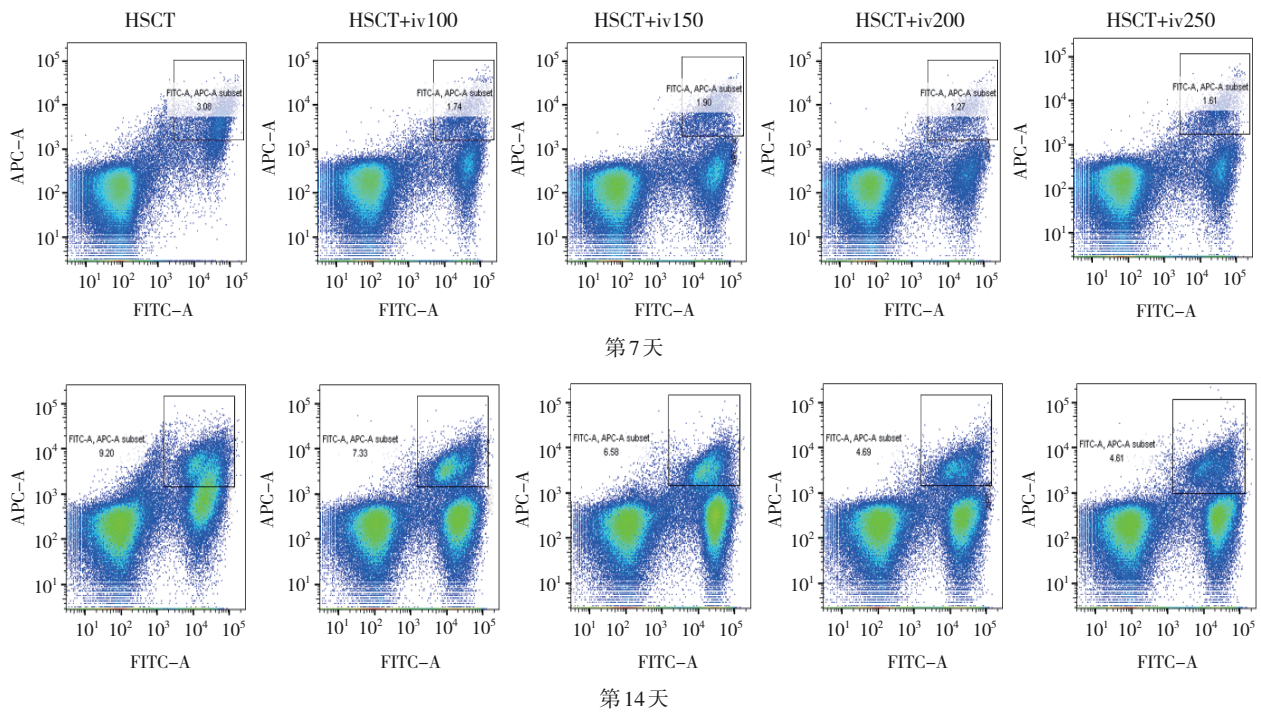
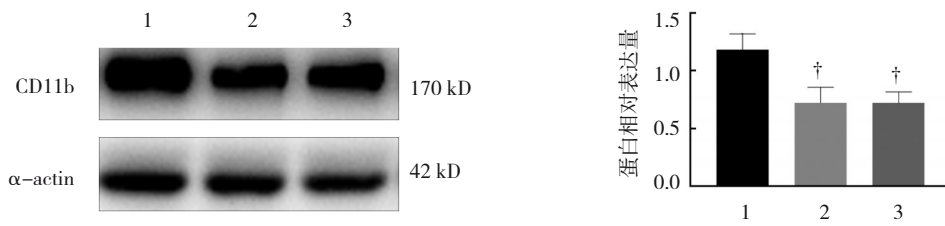
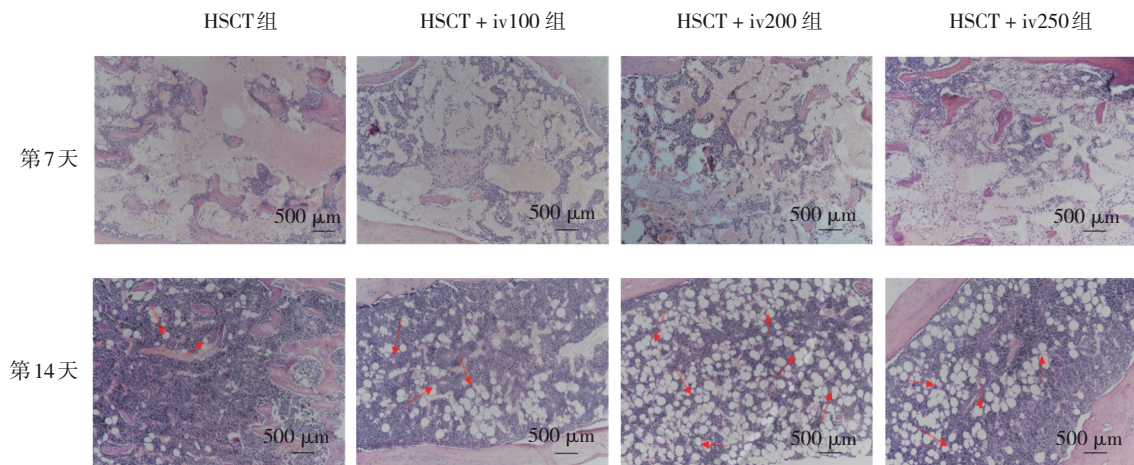


图 2 第 7 天和第 14 天时氯膦酸二钠脂质体不同剂量巨噬细胞占比



1: HSCT 组; 2: HSCT+iv200 组; 3: HSCT+iv250 组。†与 HSCT 组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 CD11b 蛋白表达



红色箭头标记为脂肪空泡

图 4 各组第 7 天和第 14 天时骨髓腔的病理改变 (HE 染色 $\times 200$)

3 讨论

巨噬细胞是骨髓细胞的重要组成部分, HSCT 后, 骨髓巨噬细胞大量浸润, 其具有双重作用, 既能促进炎症也能抑制炎症^[13], 在促进 HSCT 后的干细胞植入中发挥重要作用, 有助于促进组织再生及免疫调节^[14], 另外, 巨噬细胞在维持造血干细胞静止和微环境稳态中起关键作用, 成红细胞岛巨噬细胞与发育中的红系祖细胞相关^[15]。为研究巨噬细胞的作用, 通常需要复制巨噬细胞耗竭的动物模型, 研究表明氯膦酸二钠脂质体分为口服剂型和注射剂型, 由于氯膦酸二钠脂质体的亲水性, 使人体口服氯膦酸二钠脂质体的胃肠吸收率低。注射氯膦酸二钠脂质体是医学界公认且常用的清除体内巨噬细胞的方法, 实验操作简单, 易于复制。目前氯膦酸二钠脂质体注射方式多样, 注射剂量没有明确的说明, 随着技术的不断进步, 寻找氯膦酸二钠脂质体清除骨髓腔巨噬细胞的最佳注射方式和最佳注射剂量为节约时间和用药成本提供了新希望。

不同注射方式对器官的作用效果不同, 腹腔注射链脉佐菌素是构建糖尿病模型的主流方法, 但腹腔注射不可能靶向单个器官, 相比之下, 静脉注射链脉佐菌素所诱导的糖尿病模型更稳定且重复性好^[16]。腹腔注射氯膦酸二钠脂质体可有效清除肠道及小鼠体内巨噬细胞, 清除巨噬细胞后会加重小鼠溃疡性结肠炎^[17], 但对别的器官影响较小。为探究 HSCT 后使用氯膦酸二钠脂质体清除小鼠骨髓中巨噬细胞的最佳方式, 将腹腔注射及静脉注射对骨髓中巨噬细胞的清除效果进行对比, 本研究结果发现, 在 HSCT 模型中, 相较于腹腔注射, 静脉注射氯膦酸二钠脂质体对巨噬细胞清除效果明显。为探索氯膦酸二钠脂质体清除骨髓巨噬细胞的最佳注射剂量, 设置不同的剂量梯度, 发现随着注射剂量的提高, 骨髓巨噬细胞清除效果越明显, 200 μL 和 250 μL 相比, 清除效果相差很小。考虑到用药成本, 氯膦酸二钠脂质体注射剂量到 200 μL 就可以达到很好的清除效果。通过病理染色发现, 与 HSCT 组相比, 注射氯膦酸二钠脂质体后, 骨髓腔内的脂肪细胞明显增加, 脂肪细胞在骨髓微环境的造血过程中具有复杂的作用^[18], 被认为是造血功能不良的骨髓细胞的“空间填充物”^[19]。

综上所述, 在小鼠 HSCT 模型中, 静脉注射氯膦

酸二钠脂质体清除骨髓中巨噬细胞效果更好, 在一定剂量范围内随着注射剂量的增加, 骨髓中巨噬细胞清除效果越来越明显, 当注射剂量达到 200 μL 就可以达到最佳清除效果。本文研究了氯膦酸二钠脂质体清除骨髓腔中巨噬细胞的方式和注射剂量, 表明不同的给药途径, 可以清除特定器官或组织中的巨噬细胞, 为研究其他脏器内巨噬细胞清除的注射方式及注射剂量提供一定的实验室依据。

参 考 文 献 :

- [1] NGUYEN T, DU J, LI Y C. A protocol for macrophage depletion and reconstitution in a mouse model of sepsis[J]. STAR Protoc, 2021, 2(4): 101004.
- [2] MCCLOSKEY E, PATERSON AH, POWLES T, et al. Clodronate[J]. Bone, 2021, 143: 115715.
- [3] OPPERMAN K S, VANDYKE K, CLARK K C, et al. Clodronate-liposome mediated macrophage depletion abrogates multiple myeloma tumor establishment in vivo[J]. Neoplasia, 2019, 21(8): 777-787.
- [4] HAN J Q, ZHANG X, LAU J K C, et al. Bone marrow-derived macrophage contributes to fibrosing steatohepatitis through activating hepatic stellate cells[J]. J Pathol, 2019, 248(4): 488-500.
- [5] TACCONI C, COMMERFORD C D, DIETERICH L C, et al. CD169⁺ lymph node macrophages have protective functions in mouse breast cancer metastasis[J]. Cell Rep, 2021, 35(2): 108993.
- [6] ZHOU P, GUO H, LI Y Q, et al. Monocytes promote pyroptosis of endothelial cells during lung ischemia-reperfusion via IL-1R/NF- κ B/NLRP3 signaling[J]. Life Sci, 2021, 276: 119402.
- [7] 纳仁高娃, 米焱, 吕丽. IRF5 通过 MYD88/TGF- β 1/Smads 信号通路介导 Ang II 诱导巨噬细胞的极化和炎症反应[J]. 免疫学杂志, 2022, 38(10): 846-853.
- [8] 李爽, 刘金玉, 武晓玉, 等. 氯膦酸二钠脂质体清除肝内巨噬细胞对 CCl₄ 诱导的慢性肝损伤大鼠门脉高压的影响[J]. 实用肝脏病杂志, 2020, 23(4): 484-487.
- [9] 杨骁, 杨欣, 张晓龙. 氯膦酸二钠脂质体清除巨噬细胞对小鼠造血干祖细胞归巢过程的影响[J]. 河北医科大学学报, 2022, 43(2): 135-139.
- [10] VIOLA A, MUNARI F, SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ R, et al. The metabolic signature of macrophage responses[J]. Front Immunol, 2019, 10: 1462.
- [11] ZHAO H Y, ZHANG Y Y, XING T, et al. M2 macrophages, but not M1 macrophages, support megakaryopoiesis by upregulating PI3K-AKT pathway activity[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 234.
- [12] WANG W W, YE Y L, DU Y W, et al. EPC infusion ameliorates acute graft-versus-host disease-related endothelial injury after allogeneic bone marrow transplantation[J]. Front Immunol,

- 2022, 13: 1019657.
- [13] HANAKI R, TOYODA H, IWAMOTO S, et al. Donor-derived M2 macrophages attenuate GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Immun Inflamm Dis*, 2021, 9(4): 1489-1499.
- [14] ZHA J, KUNSELMAN L K, XIE H M, et al. Inducible Sbds deletion impairs bone marrow niche capacity to engraft donor bone marrow after transplantation[J]. *Blood Adv*, 2022, 6(1): 108-120.
- [15] SEYFRIED A N, MALONEY J M, MACNAMARA K C. Macrophages orchestrate hematopoietic programs and regulate HSC function during inflammatory stress[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1499.
- [16] 张秋林, 林慧婷, 周格, 等. 链脲佐菌素腹腔注射制作大鼠 2 型糖尿病模型的方式与剂量研究[J]. *按摩与康复医学*, 2023, 14(2): 77-80.
- [17] 浦佩珉, 卞兆连, 包元飞, 等. 清除巨噬细胞加重葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠溃疡性结肠炎[J]. *重庆医学*, 2019, 48(24): 4141-4146.
- [18] MATSUSHITA Y, ONO W, ONO N. Toward marrow adipocytes: adipogenic trajectory of the bone marrow stromal cell lineage[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 882297.
- [19] HAWKES C P, MOSTOUFI-MOAB S. Fat-bone interaction within the bone marrow milieu: Impact on hematopoiesis and systemic energy metabolism[J]. *Bone*, 2019, 119: 57-64.
- (张西倩 编辑)
- 本文引用格式:** 王玉寒, 刘志婷, 徐紫洁, 等. 氯膦酸二钠脂质体不同给药剂量和方式对骨髓巨噬细胞清除效果的研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(21): 41-48.
- Cite this article as:** WANG Y H, LIU Z T, XU Z J, et al. Research of effect of different doses and modes of liposome administration on the clearance of bone marrow macrophages[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(21): 41-48.